DOI:10.12441/spyswjs.20241221001 [文章编号] 1673-1689(2025)02-0154-09

离子交换色谱技术在大鼠粪便肠道菌群分析中的应用研究

陈灼娟[1] 邱丹腾[2] 张海玲[2] 刘树滔[1,2*]

(1. 福州大学至诚学院,福建 福州 350002; 2. 福州大学生物工程研究所,福建 福州 350002)

摘要:【目的】探究离子交换色谱技术作为大鼠粪便样本预处理方法的可行性。【方法】采集大鼠粪便样本后分别进行3种预处理:对照组(Con组)、离心分离预处理组(Cen组)和色谱分离预处理组(Chr组),比较不同预处理方法下样本的DNA提取质量、16S rRNA扩增子高通量测序结果及特定菌群的实时荧光定量PCR结果的差异。【结果】Chr组样本提取的DNA质量浓度分别是Cen组和Con组的1.44倍和6.49倍;Con组样本的操作分类单元(OTUs)数量为2 630个,而Cen组和Chr组分别增至3 220个和3 223个。α多样性分析和β多样性分析结果表明,Chr组样本具有更高的微生物多样性,且组内样本间相似度高、重现性好。实时荧光定量PCR结果表明,3组样品的青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)丰度差异极显著:Chr组样本的青春双歧杆菌丰度最高,其次是Cen组,Con组最低;当菌悬液添加量从100 μL增至200 μL时,Con组的青春双歧杆菌丰度无显著差异(P>0.05),而Cen组和Chr组分别提升至1.32倍和1.70倍,这表明离子交换色谱能更好地保留粪便样本中的微生物。【结论】离子交换色谱作为大鼠粪便样本的预处理方法,能够显著提高肠道菌群分析的重现性和灵敏度。

关键词:离子交换色谱;肠道菌群;高通量测序;微生物多样性;荧光定量PCR

Application of Ion Exchange Chromatography in the Analysis of Rat Intestinal Flora in Fecal Samples

CHEN Zhuojuan[1] *QIU Danteng*[2] *ZHANG Hailing*[2] *LIU Shutao*[1,2*]

(1. Fuzhou University Zhicheng College, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Biotechnology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: [**Objective**] The aim of the study is to explore the feasibility of ion exchange chromatography as a pre-treatment method for rat fecal samples. [**Method**] Rat fecal samples were collected and pretreated with three different methods: control (Con) group, centrifugation (Cen) group, and ion exchange chromatography (Chr) group. The DNA extraction quality, 16S rRNA amplicon high-throughput sequencing results, and real-time fluorescence quantitative PCR detection results of specific bacterial groups were compared between samples pretreated with different methods. [**Result**] The mass concentration of DNA extracted from samples of the Chr group was 1.44 times that of the Cen group and 6.49 times that of the Con group. The number of operational taxonomic unites (OTUs) in the Con group was 2 630, while the number increased to 3 220 and 3 223 in the Cen group and Chr group, respectively. α diversity and β diversity analyses indicated that the Chr group had higher microbial diversity, higher similarity and repeatability among the samples within the group. The results of real-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31271859);福建省大学生创新创业项目(S202413470028);福州大学至诚学院大学生创新创业项目(2023040),福州大学至诚学院科教创新群体培育项目(ZCKC23015)。

通信作者:刘树滔(1970—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品与健康研究。E-mail:stliu@fzu.edu.cn

收稿日期:2024-12-21 **修回日期:**2025-01-22

time fluorescence quantitative PCR showed that the abundance of *Bifidobacterium adolescentis* was different among the three groups. Specifically, the abundance of *Bifidobacterium adolescentis* was the highest in the Chr group, moderate in the Cen group, and the lowest in the Con group. When the volume of bacterial suspension added increased from 100 μL to 200 μL, there was no significant difference in the abundance of *Bifidobacterium adolescentis* in the Con group (P>0.05), while the abundance increased to 1.32 times in the Cen group and 1.70 times in the Chr group. This indicated that ion exchange chromatography better preserved the microorganisms in rat fecal samples. [**Conclusion**] As a pretreatment method of rat fecal samples, ion exchange chromatography can improve the repeatability and sensitivity of the analysis of intestinal flora.

Keywords: ion exchange chromatography; intestinal flora; high-throughput sequencing; microbial diversity; real-time fluorescence quantitative PCR

肠道菌群在维护人体健康方面起着至关重要的作用。环境卫生的改变、生活方式的调整、膳食结构的转变以及生理状态的波动均可显著影响人体肠道菌群的组成。肠道菌群紊乱可能导致免疫系统功能受损，甚至引发代谢性疾病[1-3]。目前，针对肠道菌群的分析技术主要包括分子杂交技术[4]、末端限制性片段长度多态性分析技术[5]、变性梯度凝胶电泳技术[6]、实时荧光定量PCR技术[7]及高通量测序分析技术[8-10]等。这些分子生物学分析技术的准确性高度依赖肠道微生物基因组DNA的提取质量。粪便样本的采集方法、保存条件以及预处理流程均会对DNA的提取质量产生显著影响，进而导致肠道菌群分析结果出现偏差[11-13]。因此，优化粪便样本的预处理方法，进而提高微生物基因组DNA的提取质量，对肠道菌群研究的准确性和可靠性至关重要。

离子交换色谱技术是一种快速、高效的生物大分子分离技术。该技术利用离子交换柱中的带电功能离子，特异性吸附样本中携带相反电荷的组分，从而实现靶向分离。细菌的细胞壁和细胞膜由蛋白质、脂质、磷壁酸、多糖等多种生物大分子构成，从而赋予其表面特定的电荷特性[14-15]。在中性和碱性环境中，细菌通常带负电荷，能与阴离子交换树脂结合，进而实现细菌的分离。近年来，离子交换色谱技术在微生物的分离领域中取得了显著进展[16-18]，已成功用于分离金黄色葡萄球菌、青枯细菌、红曲细菌等微生物[19-21]。然而，关于离子交换色谱技术在粪便样本预处理过程中对微生物DNA提取质量及肠道菌群分析结果的影响鲜有报道。

高通量测序和实时荧光定量PCR是当前肠道菌群分析的重要手段。高通量测序技术可同时分析多个样本，具有自动化程度高、灵敏度高、准确性高等优点[22]；实时荧光定量PCR技术具有定量精准、操作便捷、灵敏度高、重复性好等优点，在肠道菌群研究中广泛应用[23]。作者以大鼠粪便为样本，在提取微生物基因组DNA前采用离子交换色谱技术预处理以富集微生物，结合高通量测序和荧光定量PCR方法，评估离子交换色谱预处理对大鼠粪便中肠道菌群分析结果的影响，旨在为肠道菌群研究提供更精确、更稳定的预处理策略。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SD雄性大鼠：体质量为（280±20）g，上海禹堃实验动物有限公司。大鼠饲养于SPF级屏障系统，饲养温度为（25±1）℃，相对湿度为（50±10）%，自由饮食。动物试验许可证号为SCXK（浙）2019-0002。青春双歧杆菌：作者所在实验室保存。

Toyopearl DEAE-650M弱阴离子交换树脂：日本TOSOH公司；E.Z.N.A®.Mag-Bind® Stool DNA Kit：OMEGA公司；Qubit 3.0 DNA检测试剂盒：赛默飞世尔科技（中国）有限公司；TAKARA-TA克隆试剂盒：宝生物工程（大连）有限公司；SK8131 SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、SK9307快速感受态细胞制备试剂盒、SK 8191 SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒、PCR引物：生工生物工程（上海）股份有限公司；其他化学试剂：国药集团化学试剂有限公司。

平衡缓冲液（A液）：0.02 mol/L哌嗪-HCl缓冲液（pH 8.0），过滤除菌后于4 ℃保存。

洗脱缓冲液（B液）：0.02 mol/L哌嗪-HCl缓冲液（pH 8.0）+1.00 mol/L NaCl，过滤除菌后于

4 ℃保存。

样品处理液（C 液）：0.02 mol/L 哌嗪−HCl 缓冲液（pH 8.0）+0.15 mol/L NaCl+0.16 mol/L $(NH_4)_2SO_4$，过滤除菌后于 4 ℃保存。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪：DL2000 型，日本 Hitachi 公司；pH 计：FE20 型，梅特勒−托利多（上海）有限公司；PCR 仪：S1000™ Thermal Cycler 型，美国 Bio-Rrd 公司；高速离心机：CF15RXII 型，日本 Hitachi 公司；荧光定量 PCR 仪：Light Cycler 480 II 型，美国 Roche 公司；测序仪：Miseq PE300 型，美国 Illumina 公司；凝胶成像系统：FR980 型，上海复日科技有限公司；基因测序仪：3730XL 型，美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠粪便样本采集与预处理方法

采集大鼠新鲜粪便，迅速置于液氮罐中，于 −80 ℃冰箱中保存备用。将大鼠粪便混合均匀，每份样品称取 5.0 g，按照以下 3 种方法进行预处理。

1）Con 组：将 5.0 g 粪便样本直接悬浮于 5 mL PBS 缓冲液中。

2）Cen 组：将 5.0 g 粪便样本悬浮于 200 mL C 液中，搅拌混匀 30 min，用纱布过滤去除大颗粒物质。滤液先于 270 *g* 离心 2 min，取上清液，再于 12 000 *g* 离心 5 min，取沉淀。用 A 液洗涤沉淀 3 次后悬浮于 5 mL PBS 缓冲液中。

3）Chr 组：取 5.0 g 粪便样本，按 Cen 组的预处理方法进行至 A 液洗涤沉淀 3 次步骤，然后用 20 mL A 液悬浮并混合均匀，作为色谱样品进行色谱分离。

色谱参数：Toyopearl DEAE-650M 弱阴离子交换树脂色谱柱（200 mm×4.6 mm），流量 1 mL/min，泵压 0.5~1.5 MPa，柱温 23~28 ℃，检测波长 260 nm。

洗脱方法：采用混合式上样一步洗脱法，取 10 mL 样品与 30 mL 树脂充分摇匀，静置 10 min 后上样。进样后，先用 A 液平衡 30 min，使微生物充分吸附到树脂上，再用 B 液洗脱 30~200 min，去除吸附于树脂上的微生物。洗脱流量 1 mL/min，每 2 min 收集 1 管样品。20 mL Chr 组样品分 2 次进行色谱分离，合并后悬浮于 5 mL PBS 缓冲液中。

1.3.2 基因组 DNA 提取

大鼠粪便样本预处理后，按照 E.Z.N.A®. Mag-Bind® Stool DNA Kit 试剂盒说明书提取各样本的微生物基因组 DNA。然后使用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测 DNA 的纯度和质量浓度。

1.3.3 PCR 扩增及高通量测序

细菌是动物胃肠道的主要微生物种类[24]，因此选取 16S rRNA 基因 V_3 区进行高通量测序分析。采用两步 PCR 扩增法构建文库：第一轮 PCR 以提取的样本基因组 DNA 为模板，使用 341F 引物（5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′）和 518R 引物（5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′）扩增 16S rDNA V_3 区，扩增产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测后，通过切胶回收纯化，作为第二轮 PCR 扩增的模板；第二轮 PCR 使用 Illumina 桥式 PCR 兼容引物扩增，产物检测方法同第一轮产物。

纯化的 PCR 产物由生工生物工程（上海）股份有限公司测序。数据经过滤、去噪、拼接、去除嵌合体等处理后，以 97% 相似度阈值对序列聚类，获得 OTUs，最终基于样本的 OUTs 进行生物信息统计分析。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测青春双歧杆菌丰度

青春双歧杆菌经复苏活化后，接种于 TPY 肉汤培养基，加入 1 cm 液体石蜡以隔绝空气，于 37 ℃培养至对数生长期。取 2 mL 青春双歧杆菌培养物，于 4 ℃、12 000 *g* 离心 3 min，取菌体沉淀，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后充分悬浮于 2 mL PBS 缓冲液中，备用。提取菌悬液基因组 DNA 并进行实时荧光定量 PCR 检测，测得菌悬液中青春双歧杆菌基因丰度为（6.88±0.65）×10^7 copies/mL。

在 5.0 g 粪便样本中分别添加 0、100、200 μL 青春双歧杆菌菌悬液，按 1.3.1 中所述的 3 种方法进行预处理。提取各样本微生物基因组 DNA 进行实时荧光定量 PCR 扩增，并对青春双歧杆菌进行定量检测。

1.3.5 数据分析

使用 GraphPad Prism（v6.0）和 R（v3.2）统计软件进行统计学分析，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与讨论

2.1　离子交换色谱分离预处理大鼠粪便效果

利用阴离子交换树脂DEAE色谱柱对大鼠粪便样本进行预处理，洗脱曲线见图1。洗脱曲线出现2个明显的吸收峰，峰形较为尖锐，峰较窄，基线保持在较低水平。对洗脱组分进行显微镜镜检，结果显示，峰1组分主要为非菌体杂质，而峰2组分中有大量菌体细胞。上述结果表明，阴离子交换色谱预处理方法能够富集粪便样本中的菌体细胞，实现菌体细胞与非菌体杂质的有效分离。

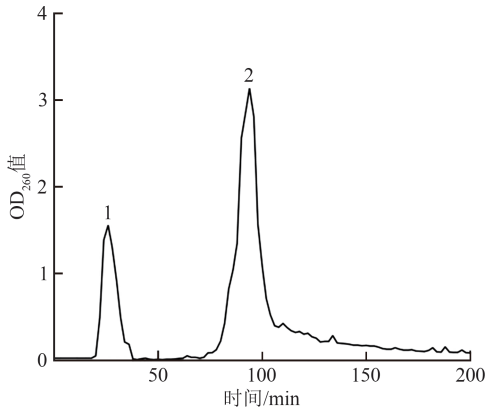


图1　大鼠粪便样本的DEAE柱色谱分离图

Fig. 1　DEAE column chromatography separation of rat fecal samples

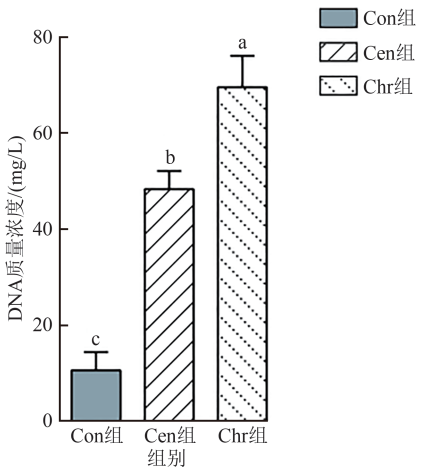
2.2　预处理方法对微生物基因组DNA质量浓度的影响

3种预处理方法提取的微生物基因组DNA的OD_{260}值/OD_{280}值均为1.8~2.0，符合DNA纯度要求。对提取的DNA质量浓度进行统计分析，发现不同预处理方法对样本DNA的提取质量浓度有极显著影响（P<0.01），见图2。Chr组样本提取的DNA质量浓度最高，分别为Cen组和Con组的1.44倍和6.49倍。结果表明，阴离子交换色谱预处理法可显著提高粪便样本的DNA质量浓度。这可能是由于该方法能够更有效地去除粪便样本中的非菌体杂质，从而提高了DNA的质量浓度。

2.3　微生物高通量测序结果

2.3.1　样本OTUs数量差异性分析

不同预处理组样本间的OTUs数量差异结果见图3。Con组的OTUs数量为2 630个，而预处理后Cen组和Chr组的OTUs数量分别增至3 220个和3 223个，且两者的重叠度最高，表明预处理后2



不同小写字母表示差异极显著（P<0.01）。

图2　各样本组的DNA质量浓度

Fig. 2　DNA mass concentration in each group of samples

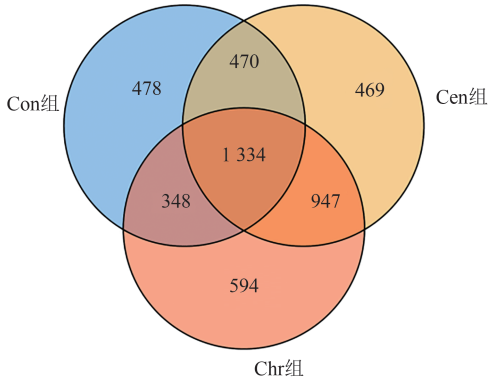


图3　韦恩图

Fig. 3　Venn diagram

组样本的物种种类较为接近。不同预处理方法间的样本OUTs数目存在明显差异，进一步印证了肠道菌群分析结果受样本预处理方法的影响，大鼠粪便样本经预处理后，物种种类更为丰富。

2.3.2　α多样性分析

α多样性分析用于评估样本的物种多样性，涵盖物种组成的丰富度和均匀度2个维度[25]。ACE指数、Chao指数、Shannon指数、Simpson指数是衡量α多样性的常用参数。其中ACE指数和Chao指数用于评估微生物群落的丰富度，指数越大，表明丰富度越高[26-27]。由图4(a)~(b)可知，Chr组和Cen组的微生物群落丰富度明显高于Con组。Shannon指数和Simpson指数可反映物种丰富度和均匀度，Shannon指数越大或Simpson指数越小，表明多样性越高。由图4(c)~(d)可知，Chr组和Cen组的多样性明显高于Con组。Chr组的箱型最为集中，说

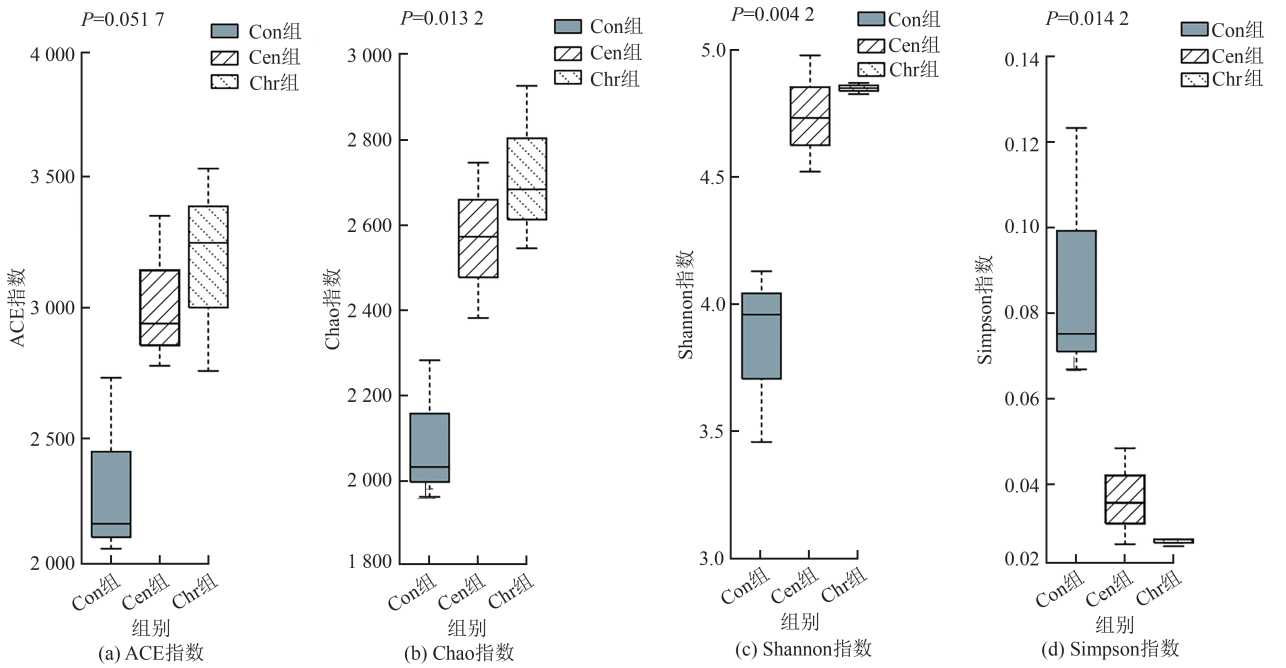


图 4　α 多样性指数箱型图

Fig. 4　Box plot of α diversity

明 Chr 组内所有样本差异较小，重现性好；Con 组的箱型最宽，说明样本间离散程度大，重现性低。这些结果表明，离子交换色谱作为大鼠粪便样本微生物群落分析的预处理手段，能够显著提高样本微生物的多样性，提升高通量测序分析质量。

2.3.3　β 多样性分析

主成分分析（principal component analysis，PCA）是从原始数据中提取样本中最主要的差异特征（主成分），并根据这些特征将样本投影在低纬度坐标中排序，样本点距离的远近直接反映样本间的群落差异特征[28]。细菌群落第一组分 PCA1 的贡献率为 93%，第二组分 PCA2 的贡献率为 6%，表明该模型效果良好，见图 5。在 PCA 图中，每个图标代表一个样本，相同形状/颜色的样本来自同一组。由图 5（a）可以看出，Con 组内样本之间距离较远，表明未经预处理直接提取 DNA 的方法容易导致样本间群落差异较大；Cen 组内样本间距离较近，Chr 组内样本最为集中，说明经过离子色谱预处理后样本的群落结构相似性高，重现性好，试验结果更为可靠。

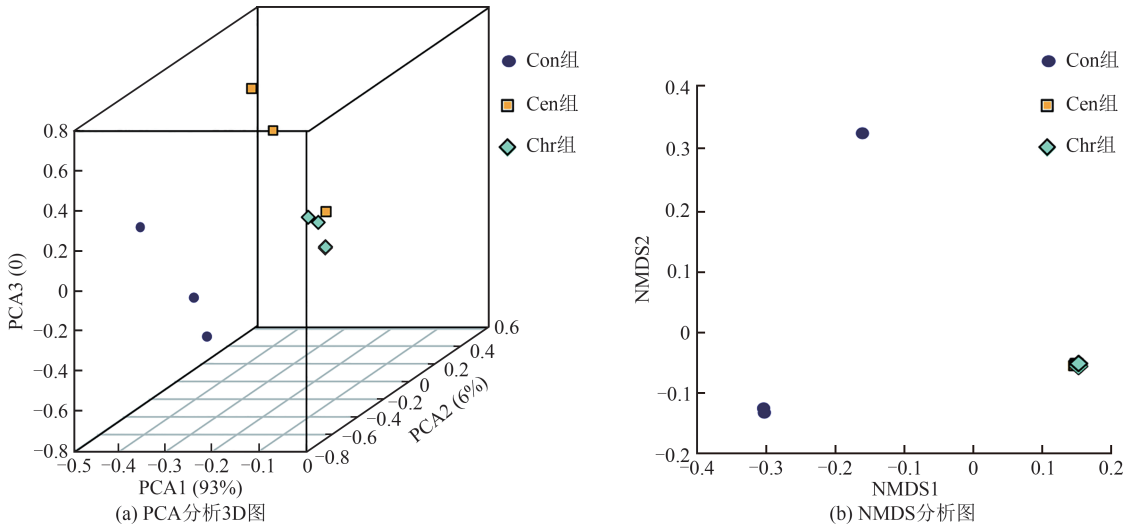


图 5　PCA 分析图与 NMDS 分析图

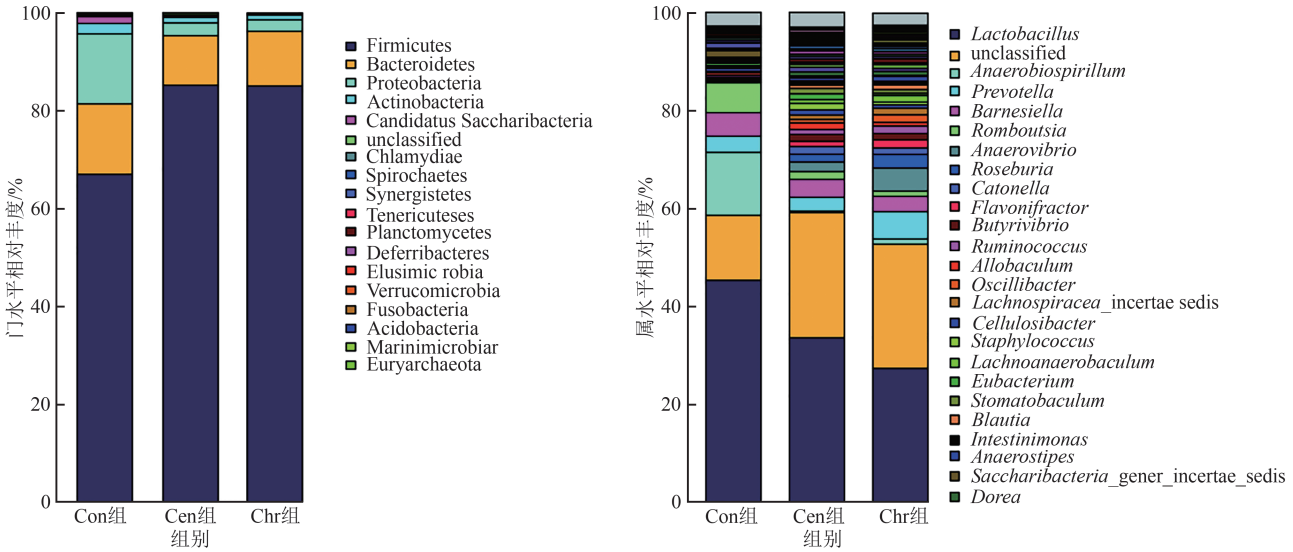
Fig. 5　PCA plot and NMDS analysis plot

采用非度量多维尺度分析（non-metric multidimensional scaling，NMDS）对样本距离进行等级排序，用于分析样本间关系和群落结构的差异，同组样本点之间的距离长短说明样本重复性的强弱。在NMDS图中，相同颜色/形状的样本来自同一分组。2个样本之间距离越近，表明两者的群落结构差异越小。由图5(b)可以看出，Con组内样本距离较远，说明未进行预处理的样本微生物群落在空间尺度上变化较大；而Cen组和Chr组的聚类效果较好，说明粪便样本预处理的方式对后续细菌群落结构组成影响显著。通过离心或离子交换色谱的分离，可以有效去除杂质并富集微生物，使样本在重复试验中能够呈现出更加一致的群落组成和结构特征。

2.3.4　样本微生物种群归类分析

图6(a)为基于门水平上3个样本组的群落结构分布图。在门水平上，大鼠粪便样本中的细菌主要隶属于18个菌门。在各样本中，厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）、变形菌门（Proteobacteria）是主要的优势菌群（相对丰度>2%），这3个菌门总相对丰度为95.55%~98.60%。与Con组相比，Cen组和Chr组的厚壁菌门相对丰度明显增加，而变形菌门的相对丰度则明显降低。上述结果表明，粪便样本的预处理方法对样本的微生物群落结构有显著影响。

图6(b)为属水平的物种群落结构分布柱状图。相对丰度值前50的微生物物种按从高到低的顺序排列，图中仅显示排序前25的物种。相对丰度排名前10的菌属为乳酸菌属（*Lactobacillus*）、未分类菌属（unclassified）、厌氧螺菌属（*Anaerobiospirillum*）、普氏菌属（*Prevotella*）、巴恩斯氏菌属（*Barnesiella*）、罗姆布茨菌属（*Romboutsia*）、厌氧弧菌属（*Anaerovibrio*）、罗斯氏菌属（*Roseburia*）、卡氏菌属（*Catonella*）和解黄酮菌属（*Flavonifractor*）。Con组中这些物种的总相对丰度为86.46%，Cen组与Chr组均为73.89%。Cen组和Chr组中未分类菌的相对丰度明显增加，而Con组中某些特定菌属（如厌氧螺菌属）的相对丰度较高。从各样本组的微生物群落结构分布图可以看出，Con组的微生物群落结构最为简单，优势物种占比大且种类少；Cen组群落结构较复杂，物种组成较丰富；Chr组的群落结构最复杂，物种组成最丰富。粪便样本经离子交换色谱预处理后，物种多样性显著增加，可为后续生态学与功能分析提供参考。



(a) 门水平各组群落结构分布图　　(b) 属水平各组群落结构分布图

图6　群落结构分布图

Fig. 6　Microbial community structure

2.3.5　基于属水平的热图分析

使用Heml 1.0软件绘制热图，实现微生物群落结构的可视化，通过不同深浅的色块表示物种丰度信息，并基于聚类分析反映样本间群落结构

的相似性。色块深浅对应测序读段的数量，红色表示物种丰度高，蓝色代表物种丰度低。通过颜色差异可直观比较不同样本的物种丰度分布。由图 7 可以看出，Cen 组和 Chr 组的群落结构更为相似，与 Con 组的差异较大。Cen 组和 Chr 组的优势物种种类较多，Con 组的优势物种种类较少，表明预处理能够富集更多的微生物，增加高丰度物种的数量，从而提升群落的物种丰富度。

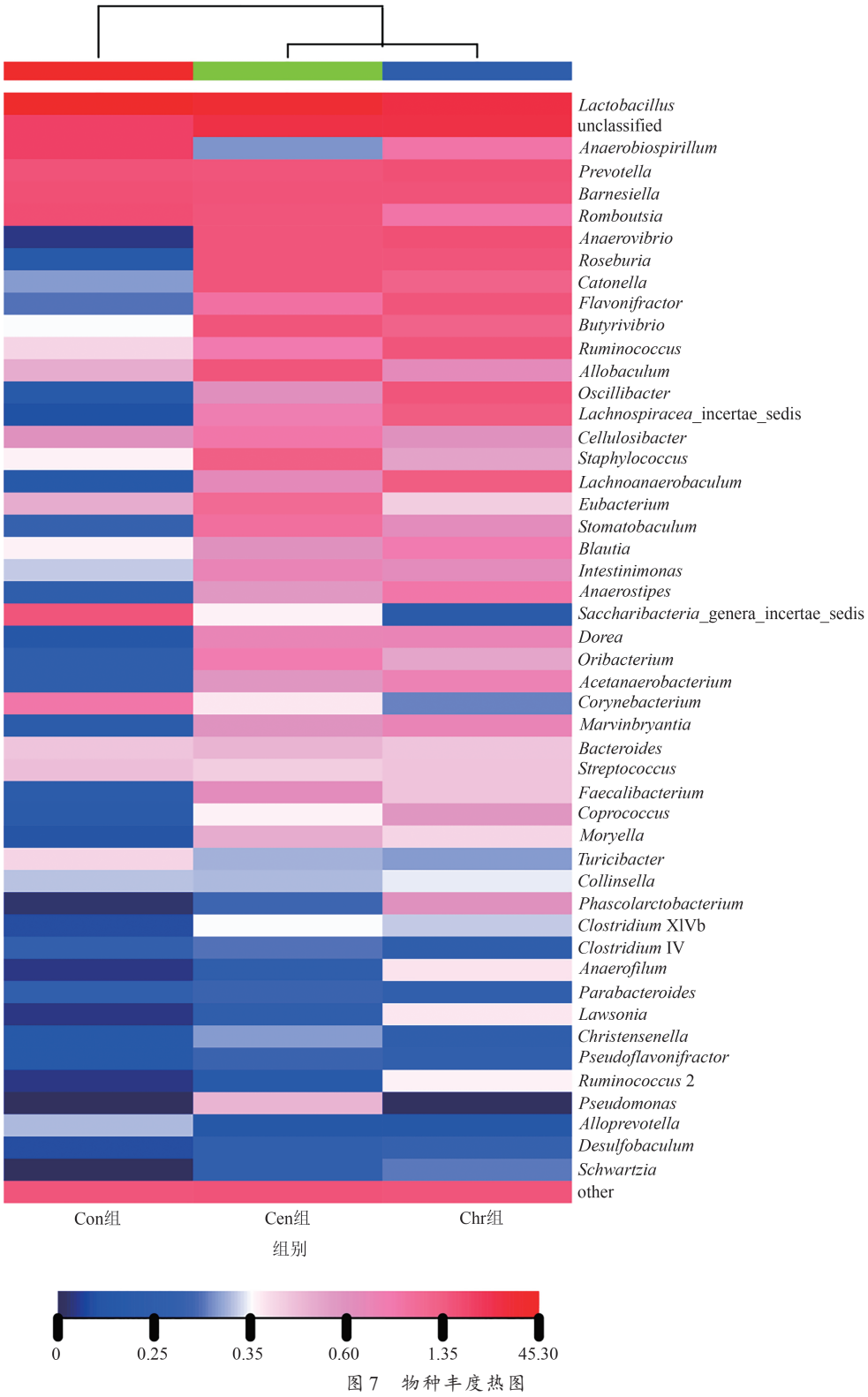
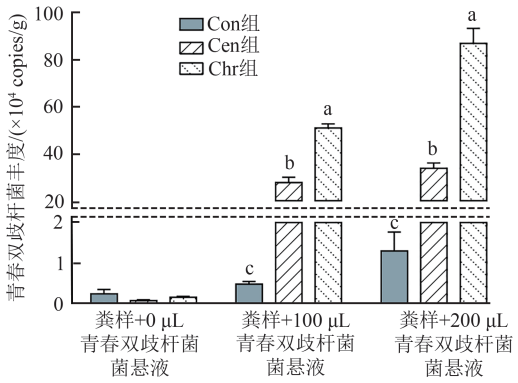


图 7　物种丰度热图

Fig. 7　Abundance heatmap at the genus level

2.4　实时荧光定量PCR检测结果

在大鼠粪便样本中添加不同体积的青春双歧杆菌菌悬液，用实时荧光定量PCR方法对样本中的青春双歧杆菌16S rRNA基因进行定量分析，探究不同预处理方法对其丰度的影响。如图8所示，在未添加青春双歧杆菌菌悬液的样本中，不同预处理方法对青春双歧杆菌的丰度无显著影响（$P>0.05$），这可能是由于粪便样本中的青春双歧杆菌丰度较低，而实时荧光定量PCR在检测低丰度菌种时误差较大；添加100 μL青春双歧杆菌菌悬液后，预处理方法对青春双歧杆菌丰度的影响极显著（$P<0.01$），其中Chr组的丰度最高，其次是Cen组，而Con组最低；添加200 μL青春双歧杆菌菌悬液时，丰度变化趋势与添加100 μL一致。当菌悬液添加量从100 μL增至200 μL时，Con组的青春双歧杆菌丰度无显著差异（$P>0.05$），而Cen组和Chr组分别提升至1.32倍和1.70倍，表明离子交换色谱分离预处理可以更好地保留粪便样本中的微生物。这一结果进一步验证了离子交换色谱预处理在富集粪便微生物方面的优势。



不同小写字母表示相同样本不同组之间差异极显著（$P<0.01$）。

图8　不同预处理方法对样本中青春双歧杆菌相对丰度的影响

Fig. 8　Effects of different pretreatment methods on the relative abundance of *Bifidobacterium adolescentis* in the samples

3　结论

将离子交换色谱技术用于大鼠粪便样本的预处理可有效富集微生物，显著提高肠道菌群基因组DNA的提取效率，且在肠道菌群多样性分析方面表现出明显优势。该研究结果证实，离子交换色谱在粪便样本的肠道菌群分离分析方面具有应用价值。由于粪便样本成分复杂，含食物残渣、消化液、消化道脱落物等杂质，现有技术仍面临诸多问题，今后需要进一步开发和优化色谱技术，以实现对微生物群落更灵敏、高效的分离分析。

参考文献

[1] ROOKS M G, GARRETT W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16(6): 341-352.

[2] MONTENEGRO J, ARMET A M, WILLING B P, et al. Exploring the influence of gut microbiome on energy metabolism in humans[J]. Advances in Nutrition, 2023, 14(4): 840-857.

[3] BORREGO-RUIZ A, BORREGO J J. Influence of human gut microbiome on the healthy and the neurodegenerative aging[J]. Experimental Gerontology, 2024, 194: 112497.

[4] APOSTOLOU E, PELTO L, KIRJAVAINEN P V, et al. Differences in the gut bacterial flora of healthy and milk-hypersensitive adults, as measured by fluorescence in situ hybridization[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2001, 30(3): 217-221.

[5] MATSUMOTO M, SAKAMOTO M, HAYASHI H, et al. Novel phylogenetic assignment database for terminal-restriction fragment length polymorphism analysis of human colonic microbiota[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 61(3): 305-319.

[6] KNAPP B A, SEEBER J, PODMIRSEG S M, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis for analysing the gut microflora of *Lumbricus rubellus* Hoffmeister under different feeding conditions[J]. Bulletin of Entomological Research, 2008, 98(3): 271-279.

[7] LAN Y, XUN S, TAMMINGA S, et al. Real-time PCR detection of lactic acid bacteria in cecal contents of *Eimeria tenella*-infected broilers fed soybean oligosaccharides and soluble soybean polysaccharides[J]. Poultry Science, 2004, 83(10): 1696-1702.

[8] LI W X, LIANG H W, HE W X, et al. Genomic and functional diversity of cultivated *Bifidobacterium* from human gut microbiota[J]. Heliyon, 2024, 10(5): e27270.

[9] ZHANG Y Y, ZHU Y, GUO Q, et al. High-throughput sequencing analysis of the characteristics of the gut microbiota in aged patients with sarcopenia[J]. Experimental Gerontology, 2023, 182: 112287.

[10] WANG P F, WANG J M, WANG L N, et al. High throughput sequencing technology reveals alteration of lower respiratory tract microbiome in severe aspiration pneumonia and its association with inflammation[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2023, 116: 105533.

[11] MARKUSKOVÁ B, MINAROVIČOVÁ J, VÉGHOVÁ A, et al. Impact of DNA extraction methods on 16S

rRNA-based profiling of bacterial communities in cheese[J]. Journal of Microbiological Methods, 2021, 184:106210.

[12] ISOKÄÄNTÄ H, TOMNIKOV N, VANHATALO S, et al. High-throughput DNA extraction strategy for fecal microbiome studies[J]. Microbiology Spectrum, 2024, 12(6):e0293223.

[13] EZZY A C, HAGSTROM A D, GEORGE C, et al. Storage and handling of human faecal samples affect the gut microbiome composition: a feasibility study[J]. Journal of Microbiological Methods, 2019, 164:105668.

[14] SZUMSKI M, KŁODZIŃSKA E, BUSZEWSKI B. Separation of microorganisms using electromigration techniques[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1084(1/2):186-193.

[15] KARTSOVA L A, MAKEEVA D V, KRAVCHENKO A V, et al. Capillary electrophoresis as a powerful tool for the analyses of bacterial samples[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2021, 134:116110.

[16] LIU S T, CHEN Z H, XIE J B, et al. High-performance ion exchange chromatography of intact bacterial cells in the manner of molecules: establishment of methodology[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(20):8544-8550.

[17] 陈雯,桂亮,林娟,等. 小鼠肠道菌群HPLC分析中色谱分离条件的优化[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(7):75-79.
CHEN W, GUI L, LIN J, et al. Optimization of separating conditions of mouse gut flora by high performance ion exchange chromatography analysis[J]. China Biotechnology, 2007, 27(7):75-79.(in Chinese)

[18] 陈强. 高效液相离子交换色谱在细菌学上的应用[D]. 福州:福州大学,2002.

[19] 陈昭华,刘树滔,薛伟明,等. 对数期金黄色葡萄球菌的离子交换色谱行为及其表征[J]. 色谱,2004,22(3):234-236.
CHEN Z H, LIU S T, XUE W M, et al. Ion-exchange chromatographic behavior and characterization of *Staphylococcus aureus* in exponential phase[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2004, 22(3): 234-236.(in Chinese)

[20] 林娟,刘树滔,高珍娜,等. 应用高效离子交换色谱分析青枯菌的致病力分化[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(5):713-718.
LIN J, LIU S T, GAO Z N, et al. Analysis of different virulent *Ralstonia solanacearum* strains using high performance ion exchange chromatography[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(5):713-718.(in Chinese)

[21] 邱丹腾,张海玲,刘树滔,等. 高效液相色谱法提高红曲细菌分离与分析的效果[J]. 中国食品学报,2019,19(6):251-256.
QIU D T, ZHANG H L, LIU S T, et al. Increasing the efficiency of the separation and analysis the bacteria in red kojic rice by using high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(6): 251-256.(in Chinese)

[22] MAHESHWARI K, MUSYUNI P, MOULICK A, et al. Unveiling the microbial symphony: next-gen sequencing and bioinformatics insights into the human gut microbiome[J]. Health Sciences Review, 2024, 11: 100173.

[23] AL-BAYATI L, NAYERI FASAEI B, MERAT S, et al. Quantitative analysis of the three gut microbiota in UC and non-UC patients using real-time PCR[J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 181:106198.

[24] ECKBURG P B, BIK E M, BERNSTEIN C N, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora[J]. Science, 2005, 308(5728):1635-1638.

[25] 范馨月,陈璐萍,朱金滔,等. 粪便样本不同保存方式对肠道菌群测序结果的影响[J]. 微生物学报,2022,62(2):520-532.
FAN X Y, CHEN L P, ZHU J T, et al. Effects of different preservation methods for fecal samples on the sequencing results of gut microbiota[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(2):520-532.(in Chinese)

[26] 许继飞. 微生物扩增子高通量测序数据分析[M]. 北京:化学工业出版社,2023:75-76.

[27] 孟潇,刘成龙,陈晨,等. 无佐剂卵清蛋白致敏BALB/c小鼠的肠道菌群变化[J]. 食品与生物技术学报,2024,43(3):14-25.
MENG X, LIU C L, CHEN C, et al. Exploration of gut microbiota changes in BALB/c mice sensitized with ovalbumin without immunologic adjuvant[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(3):14-25.(in Chinese)

[28] 梁金辉,陈文迪,吴翠芳,等. 基于16S rDNA测序研究白酒对大鼠肠道菌群的影响[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(12):98-105.
LIANG J H, CHEN W D, WU C F, et al. Effect of Baijiu on gut microbiota of rats using 16S rDNA sequencing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2023, 42(12):98-105.(in Chinese)

（责任编辑:刘冬梅）